

BAB I

LATAR BELAKANG

Saat ini, di dalam dunia kesehatan sedang terjadi fenomena mengenai penyakit kanker dan hepatitis. Dilaporkan bahwa terdapat sekitar 14.1 juta kasus mengenai penyakit kanker diseluruh dunia, dengan angka kematian mencapai 8.2 juta dimana 64% kasus kanker ini terjadi pada negara berkembang. Sementara itu, tercatat ada sekitar 6 miliar penderita yang terkena penyakit hepatitis B dan 150 juta hepatitis C, dimana 1.5 jutanya meninggal karena hepatitis C (Ferlay *et al.*, 2015). *World Health Organization* (WHO) menyebutkan bahwa hepatitis merupakan penyakit yang menyebabkan terjadinya peradangan pada bagian hati.

WHO juga menyebutkan bahwa hepatitis dapat berkembang menjadi kanker hati. Salah satu penyebab terjadinya hepatitis adalah fibrosis, namun yang paling umum, penyebab terjadinya hepatitis disebabkan karena mengkonsumsi senyawa beracun, seperti alkohol dan obat tertentu. Selain virus hepatitis, autoimun juga memungkinkan dapat terjadinya penyakit hepatitis. Hepatitis B dan C memiliki jenis genom yang berbeda. Pada hepatitis B, memiliki genom DNA sedangkan pada hepatitis C memiliki genom RNA. Namun, keduanya dapat menular dari cairan semen, cairan darah, diturunkan dari ibu ke anaknya dalam masa kandungan. Selain berbeda jenis genomnya, perbeddan lain pada kedua penyakit ini adalah pada hepatitis C belum ditemukan vaksinnnya hingga sekarang (WHO, 2016). Salah satu cara pengobatan untuk penyembuhan dari penyakit ini adalah dengan pemberian protein rekombinan.

Protein rekombinan adalah protein yang didapatkan dari hasil teknologi DNA rekombinan. Kemajuan teknologi DNA rekombinan telah mendorong berkembangnya berbagai cara produksi protein rekombinan menggunakan inang yang aman dan cukup relatif mudah untuk dilakukan pengkulturan, sehingga protein dapat diproduksi pada skala industri. Melalui teknik ini, dapat dilakukan pemindahan gen pengode enzim/protein dari suatu organisme ke organisme lain, sehingga bila enzim/protein tersebut memiliki identifikasi kandidat enzim yang cocok digunakan dalam skala industri, gen pengode enzim/protein tersebut dapat

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

dikloning dalam suatu mikroorganisme inang yang spesifik untuk dilakukan produksi dalam skala industri (Gaffar, 2010).

Protein yang digunakan dalam bidang farmasi dan kedokteran (protein terapeutik dan vaksin) pada umumnya telah diproduksi secara

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168
YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

rekombinan. *Biopharmaceutical*, adalah istilah untuk obat-obatan yang berasal dari protein rekombinan, vaksin rekombinan, dan antibodi monoklonal. Protein yang digunakan untuk kepentingan pengobatan dan terapi ini memiliki tingkat kemurnian yang sangat tinggi. Teknologi DNA rekombinan juga telah menyediakan berbagai macam strategi yang bertujuan untuk meningkatkan produksi dan mempermudah pemurnian protein (Gaffar, 2010)

Sistem ekspresi protein yang sangat umum dilakukan pada biasanya berbasis sel, dimana basis sel ini merupakan satu paket yang terdiri dari vektor ekspresi, DNA yang akan dilakukan kloning, dan sel inangnya, sehingga gen asing dapat dilakukan pengekspresian oleh sel inang dan diproduksi dalam jumlah banyak. Ekspresi protein asing ini umumnya dirancang agar terjadi dalam jumlah yang sangat banyak, atau dengan istilah overekspresi. Salah satu protein rekombinan yang dapat dilakukan overekspresi adalah *Human Interferon Alfa-2a* (hIFN α -2a) (Gaffar, 2010).

Tubuh manusia secara alami dapat menghasilkan IFN, namun terkadang jumlahnya seringkali tidak mencukupi untuk melawan agen penyakit yang berkembang secara cepat dalam tubuh. Pada kondisi tersebut, manusia memerlukan penambahan IFN dari luar tubuh. Kebutuhan IFN yang diperoleh dari luar tubuh dapat dipenuhi melalui produksi protein rekombinan IFN (Gow & Mutimer, 2001; Dingerman, 2008). Produksi beberapa jenis protein rekombinan IFN, belakangan ini terus dilakukan dengan skala yang cukup besar, salah satu protein rekombinan yang umumnya diproduksi skala besar adalah IFN α -2a manusia (rhIFN α -2a). *Human Interferon Alfa-2a* (hIFN α -2a) merupakan suatu glikoprotein, kelompok sitokinin yang memiliki susunan kurang lebih 165 asam amino dengan bobot molekul sebesar 19 kDa dan telah digunakan dalam pengobatan kanker dan hepatitis. Protein tersebut telah direkomendasikan oleh *United States Food and Drug Administration* (US FDA) pada tahun 1986 sebagai protein terapeutik untuk penanganan hepatitis dan beberapa kanker, seperti *chronic leukimia*, *renal cell carcinoma*, *epidermoid cervical cancer*, dan *medullary thyroid carcinoma* (Tagliaferri *et al.*, 2005)

Lembaga US FDA telah melakukan rekomendasi lebih dari 130 protein atau peptida untuk digunakan dalam kepentingan klinis dan 95 protein diantaranya diproduksi dengan cara teknologi DNA rekombinan. Peningkatan teknologi produksi dan pemahaman ilmu biofarmasetika

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST Pichia pastoris

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

akan mengikuti perkembangan produksi protein terapeutik sebagai langkah penting dalam penanganan berbagai macam penyakit, misalnya penyakit diabetes (insulin), stadium akhir dari penyakit gagal ginjal (eritropoetin), gangguan penyakit darah (faktor VII, VIII, IX), hepatitis dan beberapa jenis kanker (interferon) (Dingermann, 2008)

Meskipun dengan aktivitas biologisnya sebagai antivirus, imunodulator dan antiproliferasi, hIFN α -2a masih memiliki kekurangan karena senyawa ini akan tereliminasi melalui urin pada saat proses filtrasi (Ceaglio *et al.*, 2003). Selain itu, karena bobot molekul dari hIFN α -2a yang sangat kecil, maka protein ini akan terbuang pada saat proses filtrasi di glomerulus (Wang *et al.*, 2005). Untuk meningkatkan bobot molekul dari protein rekombinan ini, dilakukan fusi antara hIFN α -2a dengan *Human Serum Albumin* (HSA) (Gaffar, 2010).

Fusi albumin merupakan salah satu teknologi yang rasional, mudah dan cara yang fleksibel untuk memodifikasi hIFN α -2a. Teknologi ini bertujuan untuk meningkatkan bobot molekul protein melalui fusi hIFN α -2a dengan HSA. HSA merupakan protein utama yang terdapat didalam plasma darah yang diproduksi di dalam hati dan berperan cukup penting dalam proses osmosis darah dan membawa molekul kecil (Zhao *et al.*, 2012). Pemilihan HSA karena protein ini memiliki umur hidup 9 hari lebih lama didalam tubuh, terdistribusi luas di dalam tubuh dan tidak bersifat imunogenik (Zhao *et al.*, 2008).

Berdasarkan penelitian dari Bailon *et al.* (2001), menyatakan bahwa frekuensi pemberian hIFN α -2a bergantung pada penyakit yang diderita. Untuk perlakuan penyakit hepatitis B dan C, dan penyakit kanker, pemberian hIFN α -2a dilakukan sebanyak tiga kali per minggu dan dilakukan selama 24 minggu hingga 48 minggu kemudian. Selain pengobatan hepatitis dan kanker misalnya penyakit okuler, diberikan setiap hari setahun bahkan lebih (Bailon *et al.*, 2001). Selain itu, frekuensi pemberian dari hIFN α -2a dengan berbagai dosis akan mengakibatkan beberapa efek samping diantaranya penyakit auto imun, fibromyalgia, alopecia, dan lainnya (Reddy *et al.*, 2002). Protein rekombinan ini, dapat diproduksi dengan jumlah yang sangat banyak melalui organisme eukariotik. Salah satu contoh organisme yang cukup baik untuk memproduksi protein rekombinan ini adalah *Pichia pastoris*.

Selama 20 tahun terakhir, ragi dari *Pichia pastoris* telah luas digunakan untuk memproduksi protein rekombinan dan juga

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

dimanfaatkan pada berbagai laboratorium untuk produksi protein sebagai penelitian dasar dan aplikasi medis (De Schutter *et al.*, 2009). Meningkatnya popularitas dari penggunaan sistem ekspresi *P. pastoris* disebabkan oleh beberapa faktor utama, diantaranya: (1) *P. pastoris* dapat tumbuh hingga mencapai densitas sel yang tinggi, dan mengekspresikan protein asing dengan penginduksi metanol; (2) Teknik yang dibutuhkan untuk melakukan manipulasi genetik pada *P. pastoris* lebih mudah jika dibandingkan dengan organisme lain seperti *Saccharomyces cerevisiae*; (3) Kemampuan *P. pastoris* untuk memproduksi protein asing dalam jumlah yang cukup banyak baik secara intraselular maupun ekstraselular (De Schutter *et al.*, 2009; Glick *et al.*, 2003).

Parameter pengujian stabilitas protein fusi berupa perbedaan suhu dan lama waktu penyimpanan berperan penting dalam penanganan untuk penyakit kanker dan hepatitis. Usaha produksi protein terapeutik pada umumnya masih mengalami permasalahan yang cukup penting pada tahap stabilisasi protein. Salmannejad *et al.* (2014) menyatakan bahwa rhIFN α -2a memiliki tingkat stabilitas yang cukup rendah terhadap degradasi fisik dan kimia. Pada umumnya, tingkat ketidakstabilan yang rendah dapat terjadi selama proses preparasi, formulasi dan tahap penyimpanan (Direess *et al.*, 2010). Ketidakstabilan protein terapeutik dapat menurunkan aktifitas biologis, efek imunogenik, dan perubahan dosis selama terapi berlangsung (Ruiz *et al.*, 2006). Pengujian tingkat stabilitas protein terapeutik sangat penting diketahui untuk meningkatkan aktifitas, kelayakan dan keefektifan suatu protein terapeutik hingga mencapai tahap komersialisasi. Penelitian yang dilakukan oleh Wathon *et al.* pada tahun 2015 yang melakukan pengujian stabilitas protein terhadap rhIFN α -2b pada suhu 4°C, 25°C dan 37°C menyatakan bahwa protein tersebut mengalami degradasi lebih lambat pada protein yang disimpan pada suhu 4°C dibandingkan dengan suhu 25°C dan 37°C.

Berdasarkan uraian yang telah dijabarkan, pengujian tingkat stabilitas protein rekombinan hIFN α -2a yang difusi dengan *Human Serum Albumin* diperlukan untuk mengetahui pada suhu optimum dan lama penyimpanan dari protein untuk bertahan dari proses degradasi protein.

1.1 Rumusan Masalah

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Berdasarkan uraian latar belakang, maka rumusan masalah penelitian ini yaitu bagaimana tingkat stabilitas dari protein rekombinan hIFN α -2a yang digabungkan dengan *Human Serum Albumin* (HSA) Strain SMD1168 yang diproduksi dalam yeast *Pichia pastoris* berdasarkan perbedaan suhu dan lama waktu penyimpanan.

1.2 Pertanyaan Penelitian

Pertanyaan penelitian yang mengacu pada rumusan masalah diantaranya:

- a. Bagaimana pengaruh perbedaan suhu terhadap stabilitas protein fusi.
- b. Bagaimana pengaruh lama penyimpanan terhadap stabilitas protein fusi.

1.3 Batasan Masalah

Beberapa batasan masalah dari penelitian ini diantaranya:

- a. Protein yang digunakan merupakan protein interferon yang difusi dengan *Human Serum Albumin* (HSA) Strain SMD1168.
- b. Stok *Pichia pastoris* rekombinan yang dapat menghasilkan protein fusi yang diuji pada suhu 4°C, 25°C, dan 37°C dengan rentang waktu 6 hari lamanya.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang didapatkan dari penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui tingkat stabilitas dari protein fusi yang diuji berdasarkan perbedaan suhu.
- b. Mengetahui tingkat stabilitas dari protein fusi yang diuji berdasarkan perbedaan lama penyimpanan.

1.5 Manfaat Penelitian

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST Pichia pastoris

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Mengetahui tingkat stabilitas dari protein fusi yang diproduksi dalam yeast *P. pastoris* yang dapat digunakan untuk pengobatan dalam bidang medis.
- b. Sebagai khazanah keilmuan untuk khalayak umum dan referensi untuk khalayak khusus yang kemudian bisa dilanjutkan pada penelitian selanjutnya.

1.6 Asumsi

Asumsi yang dapat diambil berdasarkan uraian di atas menyatakan bahwa protein fusi yang diproduksi dalam yeast *Pichia pastoris* memiliki kuantitas *yield* protein yang cukup baik untuk dilakukan uji stabilitas (Ningrum, 2017).

1.7 Hipotesis

Hipotesis yang dirumuskan penelitian ini adalah parameter fisik yang meliputi suhu dan lama penyimpanan akan mempengaruhi tingkat stabilitas dari protein fusi.

1.8 Struktur Organisasi

Struktur organisasi pada karya tulis ini, menjabarkan kerangka skripsi secara garis umum, hal – hal yang terkait setiap bab, serta adanya hubungan antar babnya. Adapun struktur organisasi yang dibuat pada karya tulis ilmiah ini, mengacu pada penulisan karya tulis ilmiah Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) yang dibuat pada tahun 2016. Berdasarkan pedoman karya tulis ilmiah tersebut, struktur organisasi yang dibuat tersusun atas lima bagian, yang diantaranya adalah pendahuluan, kajian pustaka atau dasar teori, metode penelitian, temuan dan pembahasan, serta kesimpulan dan saran. Penjelasan terkait mengenai lima bagian tersebut adalah sebagai berikut;

Bab I : Pendahuluan merupakan salah satu bagian yang menjabarkan alasan dan hal – hal yang mendasari dilakukannya penelitian tersebut. Bab ini memiliki

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

beberapa poin penting, diantaranya adalah latar belakang, rumusan masalah, pertanyaan penelitian, tujuan penelitian, manfaat penelitian, dan struktur organisasi.

Bab II

: Kajian pustaka atau dasar teori memuat sumber – sumber yang didapatkan dan mendukung dalam penulisan dan penelitian. Bab ini memuat teori – teori dan deskripsi yang relevan terkait dengan tema penulisan. Bagian dari kajian pustaka ini, secara garis besar menggambarkan dan mendeskripsikan mengenai Protein terapeutik; Penemuan, Macam dan Kegunaan Interferon Aktivitas Antivirus; Aktivitas Immunodulator; Protein *Human Serum Albumin* (HSA); Proses Immuniblotting; *Pichia pastoris* dan Kegunaannya; Sistem Ekspresi dari *Pichia pastoris*; dan Tingkat Stabilitas Protein dan Faktor yang Mempengaruhi

Bab III

: Bab metode penelitian menggambarkan secara detail mengenai pengambilan data dan pengolahan data. Secara umum, pada bagian ini memberikan informasi tentang cara yang dilakukan oleh peneliti dalam memperoleh dan menganalisis data menjadi data yang informatif dalam penulisan karya tulis ilmiah. Pada bab ini, terdapat beberapa bagian, diantaranya jenis penelitian, waktu dan lokasi penelitian, alat dan bahan, prosedur penelitian, alur penelitian, dan tabel instrumen penilaian.

Bab IV

: Bab temuan dan pembahasan, memaparkan secara detail mengenai isi dari hasil penelitian yang dilakukan secara keseluruhan. Bab ini memaparkan terlebih dahulu temuan yang didapatkan selama penelitian kemudian hasil dari temuan penelitian tersebut, dikembangkan dan kemudian dibahas berdasarkan teori dan sumber referensi yang ada dalam bab kajian teori sebelumnya

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168 YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Bab V

: Kesimpulan dan saran berisikan inti dari penelitian yang telah dilakukan. Bab ini juga berisikan saran yang diajukan oleh peneliti untuk dikembangkan oleh penelitian lanjutan, dan juga sebagai khazanah keilmuan bagi masyarakat luas sesuai subbab manfaat pada bab sebelumnya.

Naufan Aldi Sujatmoko, 2018

*UJI STABILITAS PROTEIN FUSI HUMAN SERUM ALBUMIN STRAIN SMD1168
YANG DIPRODUKSI DALAM YEAST *Pichia pastoris**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu